

· 实验研究 ·

丙酮酸钠在脑缺血-再灌注损伤中的神经保护作用

张贺铭 白卫平 李江静 孙绪德

【摘要】 目的 探讨丙酮酸钠(SP)对脑缺血-再灌注(IR)损伤的影响。**方法** 雄性SD大鼠24只,体重200~250g,随机分为三组:假手术+生理盐水组(S组)、脑IR+生理盐水组(M组)、脑IR+丙酮酸钠组(P组)。S组行假手术处理,M组、P组建立大脑中动脉梗死(MCAO)模型,阻断血流2h,分别于血流再灌注时经尾静脉注射生理盐水或丙酮酸钠600 mg/kg。血流再灌注后24 h,采用TTC法测定脑梗死体积,采用mNSS评分测定神经功能缺损评分,采用Western blot法测定cleaved caspase-3、Bax、cleaved PARP-1蛋白含量以及细胞核内AIF蛋白含量,微板法测定谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)以及丙二醛(MDA)水平。**结果** 与S组比较,M组和P组脑梗死体积明显增加,mNSS评分明显升高;M组cleaved caspase-3、Bax、cleaved PARP-1蛋白含量和AIF细胞核内蛋白含量明显升高,GSH与SOD水平明显降低,MDA水平明显升高($P < 0.05$)。与M组比较,P组脑梗死体积明显减小,mNSS评分明显降低,cleaved caspase-3、Bax、cleaved PARP-1蛋白含量和AIF细胞核内蛋白含量明显降低,GSH与SOD水平明显升高,MDA水平明显降低($P < 0.05$)。**结论** 丙酮酸钠能够减轻大鼠脑IR损伤,其神经保护作用可能与减少细胞凋亡以及抑制氧化应激水平相关。

【关键词】 丙酮酸钠;缺血-再灌注;凋亡;氧化应激

Neuroprotective effect of sodium pyruvate in cerebral ischemia-reperfusion injury ZHANG Heming, BAI Weiping, LI Jiangjing, SUN Xude. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710038, China.

Corresponding author: SUN Xude, Email: sunxude@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of sodium pyruvate (SP) on cerebral ischemia-reperfusion (IR) injury. **Methods** Twenty-four male SD rats, weighing 200–250 g, were randomly divided into 3 groups: sham operation and normal saline group (group S), IR and normal saline group (group M), IR and sodium pyruvate group (group P). Sham surgical treatment was performed in group S, and MCAO model was established in group M and group P to block the blood flow for 2 h. Normal saline or 600 mg/kg sodium pyruvate were injected into the caudal vein during blood reperfusion in each group. The volume of cerebral infarction was determined by TTC and the score of neural functional defect was determined by mNSS in 24 h after reperfusion. Western blot was used to determine cleaved caspase-3, Bax, cleaved PARP-1 protein content and AIF protein content in the nucleus. Glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were determined by microplate method. **Results** Compared with group S, the cerebral infarction volume and mNSS score in group M was significantly increased, the protein content of cleaved caspase-3, Bax, cleaved parp-1 and the nuclear protein content of AIF were significantly increased, the levels of GSH and SOD were significantly decreased, and the MDA level was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group M, the cerebral infarction volume and mNSS score in group P was significantly reduced, the protein content of cleaved caspase-3, Bax, cleaved parp-1 and the nuclear protein content of AIF were significantly decreased, the levels of GSH and SOD were significantly increased, and the MDA level was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Sodium pyruvate can reduce brain IR damage in rats and its neuroprotective effect may be related to the reduction of cell apoptosis and inhibition of oxidative stress.

【Key words】 Sodium pyruvate; ischemia-reperfusion; Apoptotic; Oxidative stress

脑缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 损伤

是指大脑血流恢复后发生的更加严重的脑功能障碍。脑梗死具有发病突然、发病率高的特点,是成年人死亡和残疾的主要原因之一^[1],随着社会老龄化,中国的脑梗死发生率逐年上升,同时脑梗死的发病群体也逐年向年轻化发展。丙酮酸钠具有抗

DOI:10.12089/jca.2020.09.016

作者单位:710038 西安市,空军军医大学第二附属医院麻醉科(张贺铭、李江静、孙绪德);渭南市骨科医院麻醉科(白卫平)

通信作者:孙绪德,Email: sunxude@fmmu.edu.cn

炎抗氧化作用,同时也在既往研究中表现出脑损伤后的神经保护作用^[2-4]。本实验对丙酮酸钠在脑 IR 后的神经保护作用进行探究。

材料与方 法

实验动物与分组 SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,体重 200~250 g,购自空军军医大学实验动物中心,生产许可证号 SCXK(陕)2014-002。动物饲养环境为:温度(23±2)℃,相对湿度 45%,光照 12 h 循环,通风良好,食物与水供应充足。采用随机数字表法将大鼠随机分为三组:假手术+生理盐水组(S 组)、脑 IR+生理盐水组(M 组)、脑 IR+丙酮酸钠组(P 组)。P 组于脑血流再灌注时经尾静脉注射丙酮酸钠 600 mg/kg,另外两组注射等容量生理盐水。

大脑中动脉梗死(MCAO)模型建立 MCAO 模型采用线栓法建立^[5]。腹腔注射 1%戊巴比妥钠 40~50 mg/kg 麻醉,手术分离颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)与颈内动脉(ICA)。结扎并离断颈外动脉,于颈外动脉近心端插入线栓,将线栓向头侧推进,插入深度(18.0±0.5)mm。梗阻 2 h 后拔除线栓实现血流再灌注,所有动物于再灌注后 24 h 处死并检测。

TTC 染色 大鼠处死后断头取脑,于-20℃冰箱中冻存 5 min,在经预冷处理脑膜具上切片,自脑前级连续切取,每片 2 mm。将脑片放置于 2% TTC 染液中,37℃避光染色 30 min,4%多聚甲醛中性缓冲液固定并过夜。

神经功能评估 采用改良的神经功能评分(mNSS)法于血流再灌注后 24 h 进行评估。包括运动、感觉、反射、平衡与肌张力的检测共 18 分,正常大鼠为 0 分,分数随神经功能缺失加重而升高。

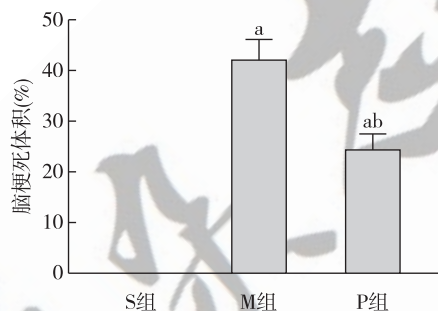
蛋白含量测定 采用 western blot 法检测 cleaved caspase-3、Bax、cleaved PARP-1 蛋白含量和细胞核内 AIF 蛋白含量。RIPA 裂解液提取总蛋白或核蛋白提取试剂盒提取核蛋白后用 BCA 法进行蛋白定量。使用 SDS-PAGE 凝胶电泳,0.2 μmPVDF 膜转膜后 BSA 封闭。加入稀释的一抗放于 4℃孵育过夜,次日 TBST 洗膜后加入二抗与室温孵育 1 h,再次 TBST 洗膜后加入发光液于凝胶成像系统曝光。

氧化应激水平测定 通过测定 GSH、SOD 以及 MDA 测定氧化应激水平。根据制造商的说明书在 96 孔板中加入相应试剂,并按照说明选取酶标仪相应波长进行测量。

统计分析 采用 SPSS24.0 统计软件进行分析,正态分布资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

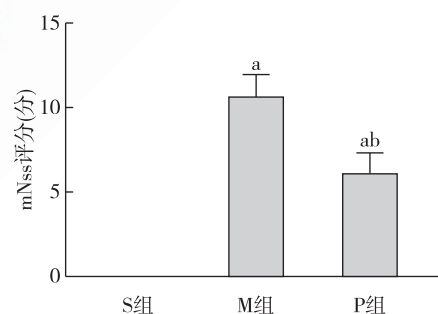
与 S 组比较,M 组和 P 组脑梗死体积明显增加($P < 0.05$);与 M 组比较,P 组脑梗死体积明显降低($P < 0.05$)(图 1)。



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 M 组比较,^b $P < 0.05$

图 1 三组大鼠脑梗死体积的比较

与 S 组比较,M 组和 P 组 mNSS 评分明显升高($P < 0.05$);与 M 组比较,P 组 mNSS 评分明显降低($P < 0.05$)(图 2)。

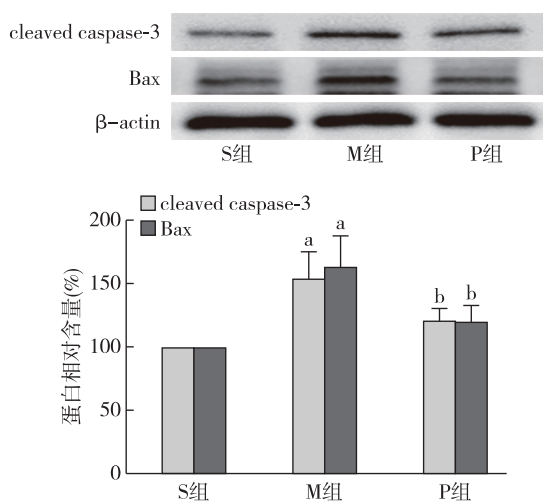


注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 M 组比较,^b $P < 0.05$

图 2 三组大鼠 mNSS 评分的比较

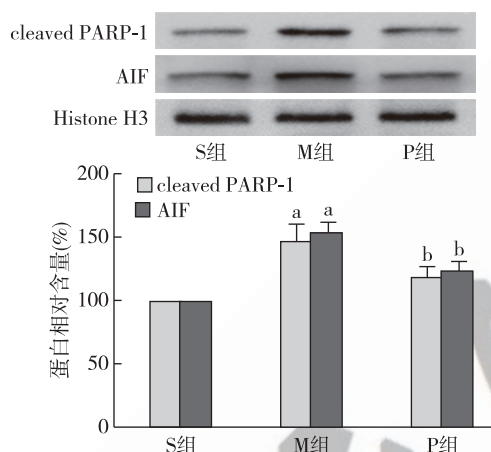
与 S 组比较,M 组 cleaved caspase-3、Bax、cleaved PARP-1 蛋白含量与 AIF 细胞核内蛋白含量明显增加($P < 0.05$);与 M 组比较,P 组 cleaved caspase-3、Bax、cleaved PARP-1 蛋白含量与 AIF 细胞核内蛋白含量明显降低($P < 0.05$)(图 3—4)。

与 S 组比较,M 组 GSH 和 SOD 水平明显降低,MDA 水平明显升高($P < 0.05$);与 M 组比较,P 组 GSH 和 SOD 水平明显升高,MDA 水平明显降低($P < 0.05$)(图 5—6)。



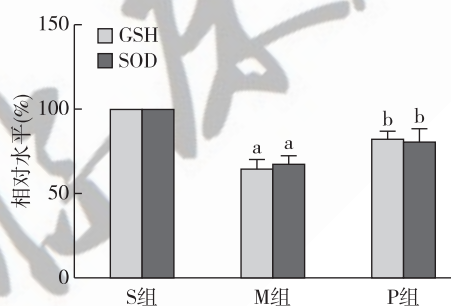
注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 M 组比较,^b $P<0.05$

图 3 三组大鼠 cleaved caspase-3 与 Bax 蛋白含量的比较



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 M 组比较,^b $P<0.05$

图 4 三组大鼠 cleaved PARP-1 蛋白含量与 AIF 细胞核内蛋白含量的比较

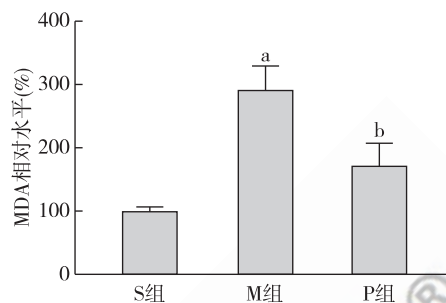


注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 M 组比较,^b $P<0.05$

图 5 三组大鼠 GSH 与 SOD 水平的比较

讨 论

脑梗死引发脑损伤不仅包括血流障碍阶段的脑缺血缺氧损伤,血流再灌注同样会损伤脑神经。



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 M 组比较,^b $P<0.05$

图 6 三组大鼠 MDA 水平的比较

脑 IR 能够激活一系列复杂的组织损伤与保护机制,但保护方式仍有待探索。本实验研究显示丙酮酸钠能够减轻脑 IR 神经损伤,其神经保护作用与降低凋亡、抑制氧化应激水平存在关联。

丙酮酸是一类三碳单羧基酸,是三羧酸循环的重要底物^[6]。其盐或脂类化合物已被证明能够清除氧自由基^[7]。在先前的研究中,丙酮酸盐类化合物的神经保护作用已在多种模型中得到验证,例如创伤性脑损伤、阿尔兹海默症以及心脏骤停后脑损伤等^[2-4]。而丙酮酸钠能够通过易化扩散的方式通过血脑屏障,外周使用后可迅速进入颅内发挥作用^[8]。在本实验中,IR 损伤使得脑梗死面积与神经缺损评分增加,而丙酮酸钠能够逆转上述结果,显示丙酮酸钠存在应对脑 IR 损伤的神经保护作用。

丙酮酸钠的神经保护作用与其抗炎抗氧化能力相关。在大鼠脑 IR 损伤后,丙酮酸钠明显降低了氧化应激水平。近年来的研究表明,铁死亡是由于谷胱甘肽耗竭以及 GPx4 失活引起脂质过氧化而产生一种细胞程序性死亡途径^[9]。而丙酮酸钠对脑组织 MDA 以及 GSH 的作用效果表明,其神经保护作用或许与此途径相关。在凋亡方面,caspase-3 是细胞凋亡级联通路下游关键的执行蛋白^[10],脑 IR 损伤能够激活 caspase-3 途径细胞凋亡,促进 Bax 介导线粒体膜通透化^[11]。PARP 是胞核多聚酶协助细胞维持生存能力,可被 caspase-3 剪切促使细胞崩解。AIF 是非 caspase 依赖途径的细胞凋亡途径中的关键分子,可通过核转位发挥促凋亡活性。本实验研究结果显示,丙酮酸钠表现出逆转脑 IR 引起 cleavedcaspase-3、cleaved PARP-1 与 Bax 蛋白含量增加的作用,同时能够抑制非 caspase 依赖细胞凋亡途径关键分子 AIF 的核转位。表明丙酮酸钠对两条细胞凋亡途径均有抑制作用。

综上所述,丙酮酸钠能够减轻大鼠脑 IR 后神经

损伤,改善神经功能。其神经保护作用可能与减少细胞凋亡和抑制氧化应激水平相关。

参 考 文 献

- [1] Yan A, Zhang T, Yang X, et al. Thromboxane A2 receptor antagonist SQ29548 reduces ischemic stroke-induced microglia/macrophages activation and enrichment, and ameliorates brain injury. *Sci Rep*, 2016, 6: 35885.
- [2] Shijo K, Sutton RL, Ghavim SS, et al. Metabolic fate of glucose in rats with traumatic brain injury and pyruvate or glucose treatments: a NMR spectroscopy study. *Neurochem Int*, 2017, 102: 66-78.
- [3] Wang X, Hu X, Yang Y, et al. Systemic pyruvate administration markedly reduces neuronal death and cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 2015, 271: 145-154.
- [4] Scott GF, Nguyen AQ, Cherry BH, et al. Featured article: Pyruvate preserves antiglycation defenses in porcine brain after cardiac arrest. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242(10): 1095-1103.
- [5] 张燕, 田婕, 何振洲, 等. 右美托咪定预处理减轻脑缺血-再灌注后的脑局部炎症反应. *临床麻醉学杂志*, 2018, 34(6): 592-596.
- [6] 邴海龙, 张希晓, 王鹏飞, 等. 右美托咪定通过 c-Fos/NLRP3/caspase-1 级联抑制 LP S 诱发的小胶质细胞炎症反应. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(8): 798-802.
- [7] Rieger E, de Franceschi ID, Preissler T, et al. Neuroprotective Effect of creatine and pyruvate on enzyme activities of phosphoryl transfer network and oxidative stress alterations caused by leucine administration in wistar rats. *Neurotox Res*, 2017, 32(4): 575-584.
- [8] Wang X, Hu X, Yang Y, et al. Systemic pyruvate administration markedly reduces neuronal death and cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 2015, 271: 145-154.
- [9] Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [10] Li W, Lou J, Wei L, et al. Ethyl pyruvate protects PC12 cells from oxygen-glucose deprivation: a potential role in ischemic cerebrovascular disease. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 168-174.
- [11] Sun D, Wang W, Wang X, et al. bFGF plays a neuroprotective role by suppressing excessive autophagy and apoptosis after transient global cerebral ischemia in rats. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 172.

(收稿日期:2019-10-16)

· 消息 ·

《临床麻醉学杂志》2021 年度征订通知

《临床麻醉学杂志》系麻醉学和相关学科的专业学术期刊,1985 年 3 月创刊。目前,本刊被国内三大核心数据库收录,包括“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊),中国科学院文献情报中心“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”,北大图书馆《中文核心期刊要目总览》(中文核心期刊)。此外,本刊被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中国期刊全文数据库(CJFD)、中文科技期刊数据库(CSTJ)、日本科学技术振兴机构中国文献数据库(JSTChina)以及美国《化学文摘》(CA)收录。2014 年 9 月和 2017 年 10 月,本刊分别入选中国科学技术信息研究所“第三届中国精品科技期刊”和“第四届中国精品科技期刊”,即“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2018 年 11 月,本刊荣获第十届江苏科技期刊“金马奖”十佳精品期刊奖。中国科学技术信息研究所《2019 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》显示,本刊核心总被引频次为 2800,核心影响因子为 1.283,在外科学期刊中位居前列。

本刊中国标准连续出版物号 CN 32-1211/R,ISSN 1004-5805。2021 年度本刊仍从邮局发行,邮发代号 28-35,大 16 开本,每期增加至 112 页,每月 15 日出版,25 元/期,全年 300 元(含邮费)。请到当地邮局或中国邮政网上营业厅(<https://11185.cn>)订阅,也可在本刊微信小店购买,或与本刊编辑部联系,地址:南京市鼓楼区紫竹林 3 号《临床麻醉学杂志》编辑部,邮编:210003,电话:025-83472912,Email:jca@lcmzxxz.com。